



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

ESTUDO IN VIVO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE
POUTERIA NUDA NA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE:
PERFIL DE CITOCINAS

BOLSISTA: ANDREY AMORIM DE LIMA, CNPQ

MANAUS

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0033/2011

ESTUDO IN VIVO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE
POUTERIA NUDA NA ARTRITE INDUZIDA POR ADJUVANTE:
PERFIL DE CITOCINAS

BOLSISTA: ANDREY AMORIM DE LIMA, CNPQ
ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ FERNANDO MARQUES
BARCELLOS

MANAUS

2012

SUMÁRIO

1. Introdução	4
2. Justificativa	6
3. Revisão de literatura	6
4. Objetivos	7
4.1. Objetivo Geral	7
4.2. Objetivos Específicos	7
5. Materiais e Métodos	7
5.1. Extrato	7
5.2. Modelo Animal	8
5.3. Modelo de Indução de Artrite (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	8
5.4. Avaliação do Desenvolvimento da Artrite	9
5.5. Via de Administração	9
5.6. Avaliação do Perfil de citocinas por Citometria de Fluxo	10
5.6.1. Coleta de Sangue por Punção Cardíaca	10
5.6.2. Análise da Amostra de Sangue no Citômetro de Fluxo para a Detecção de Citocinas	10
5.7. Eutanásia	11
5.8. Análise Estatística	11
6. Resultados	11
6.1. Protocolo Otimizado para o Experimento	11
6.2. Padronização da Dose do Medicamento Controle	12
6.3. Curva da Artrite	12
6.4. Perfil de Citocinas	13
7. Discussão	13
8. Cronograma	14
9. Referências	15

1. Introdução

Substâncias químicas derivadas de animais, plantas e microrganismos, como bactérias e fungos, têm sido utilizadas para tratar doenças humanas desde o início da medicina (Koehn e Carter, 2005). A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo, ocupa quase a metade da América do Sul e é centro de grande diversidade biológica.

Aproximadamente 125 mil espécies de plantas estão em florestas tropicais, sendo importantes reservatórios para o descobrimento de novas moléculas bioativas e agentes fitoterapêuticos. Contudo apenas 1% de todo o potencial farmacológico das florestas tropicais foi avaliado (Carneiro *et al.*, 2008).

A artrite reumatoide (AR) é uma condição clínica potencialmente grave, não só pela morbidade associada à dor, à limitação funcional e à repercussão na qualidade de vida dos pacientes, mas por mortalidade maior em relação à população em geral (Pinto *et al.*, 2006). A AR acomete grandes e pequenas articulações em associação com manifestações sistêmicas como: rigidez matinal, fadiga e perda de peso. As articulações afetadas ficam edemaciadas, quentes e dolorosas particularmente ao despertar ou após uma inatividade. Em geral os sintomas manifestam-se nas pequenas articulações das mãos (articulações metacarpofalângicas e interfalângicas proximais) e dos pés, seguidas pelos pulsos, tornozelos, cotovelos e joelhos (Van der Heijde *et al.*, 1992).

O tratamento atual da AR é insatisfatório por não levar a cura, pois só há supressão do processo inflamatório, seja de forma imediata, mas fulgaz (esteróides e anti-inflamatórios não hormonais), ou pela modificação, a longo prazo, do curso da doença (metotrexate, hidroxicloquina, sulfasalazina, leflomonde, ciclosporina-A), com ineficácia em muitos casos e significativa toxicidade (O'Dell, 2004).

A artrite inflamatória aguda e crônica, semelhante a AR, pode ser induzida experimentalmente em vários animais como: ratos, camundongos, coelhos, porcos e macacos. Os modelos experimentais de AR induzida em ratos e camundongos são bastante utilizados para avaliar os mecanismos fisiopatológicos e para buscar novas terapêuticas (Wilder *et al.*, 1999). Entre os indutores de AR experimental em Ratos (colágeno tipo II, Avridina, Pristane, entre outros) o mais estudado é o de artrite induzida por antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) emulsionados em Adjuvante Incompleto de Freund (IFA), combinação que forma o Adjuvante Completo de Freund (CFA).

Pesquisas buscam componentes com atividade farmacêutica em produtos naturais. Um componente promissor (SNX-111), extraído do veneno do molusco marinho *Conus magnus*, tem apresentado atividade analgésica até 10% mais potente que a morfina (Batulis, 1999). No Instituto Sulamericano para Desenvolvimento de Drogas Anticâncer pesquisadores buscam plantas terrestres e produtos marinhos para novas terapias que possam bloquear o crescimento de células cancerígenas.

Fitoterápicos são preparações de plantas medicinais com longo histórico de eficácia comprovada, caracterização bioquímica, provas de eficácia em testes clínicos controlados por placebo e, em alguns casos, padronização e venda com um Número de Identificação de Droga (NID) (Murch *et al.*, 2000).

A família Sapotaceae é subdividida em 5 tribos, com 53 gêneros e, aproximadamente, 1250 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia e da América do Sul (Swenson, 2005). *Sarcaulus brasiliensis*, espécie da família Sapotaceae, demonstrou atividade antiplaquetária significativa *in vitro* (Oliveira *et al.*, 2009). *Vitellaria paradoxa* tem sido utilizada popularmente com fins analgésicos, de acordo com o *Forestry Research Institute of Nigeria* (FRIN) e o *International Institute of Tropical Agriculture* (IITA) (Lawal *et al.*, 2010). Tribos do distrito de Mayurbhanj do norte de Orissa (Índia) utilizam a planta *Madhuca longifolia* var *latifolia*, da família Sapotaceae, contra doenças brônquicas e diabetes (Rout *et al.*, 2009). Os frutos da planta *Tieghemella heckelli*, outra planta pertencente à família Sapotaceae, possuem arginina C, uma saponina que inibiu fortemente a entrada do vírus HIV em células HeLa-CD4+ em um ensaio de fusão celular (Gosse *et al.*, 2002).

Várias espécies do gênero *Pouteria*, pertencente à Família Sapotaceae, como *P. caimito*, *P. cambodiana*, *P. guianensis*, *P. sapota*, *P. torta*, *P. venosa*, entre outras, têm sido utilizadas na medicina popular para tratar inflamação, úlceras, diabetes (Ma *et al.*, 2004; Montenegro *et al.*, 2006), diarreias (Perfeito *et al.*, 2005), náuseas, vômitos, dores nas costas, e para promover lactação em mães que estão amamentando (Manosroi *et al.*, 2006). A *Pouteria campechiana* é utilizada como antipirético no México e também para tratamento de erupções da pele em Cuba (Manosroi *et al.*, 2005). Considerando o grande número de pesquisas que visam a bioprospecção de produtos naturais, entre eles as plantas do Gênero *Pouteria* da Família Sapotaceae, e a falta de um tratamento definitivo para a AR, é proposto o estudo da ação *in vivo* do extrato de *Pouteria nuda* no tratamento da artrite reumatoide induzida por adjuvante.

2. Justificativa

Os estudos realizados com *P. nuda* ainda são pioneiros, porém testes *in vitro* demonstram-se promissores no combate a células tumorais (Carneiro, 2007), em relação à atividade bactericida (Carneiro *et al*, 2008), à inibição da agregação plaquetária e à atividade hemolítica (Oliveira *et al*, 2009). Pesquisas utilizando outras espécies da família Sapotaceae, a qual pertence a *P. nuda*, mostram bons resultados no tratamento do processo inflamatório.

Apesar da grande biodiversidade encontrada na Região Amazônica ainda há pouca exploração (bioprospecção) dos recursos naturais disponíveis e considerando-se que até o momento falta um tratamento definitivo para a Artrite Reumatoide, estudos em novas terapêuticas que agreguem melhora na qualidade de vida para estes pacientes se faz necessário.

3. Revisão de literatura

Citometria de Fluxo

O uso do método e dos instrumentos usados na citometria de fluxo para fins clínicos data quase do mesmo tempo em que esta tecnologia única foi introduzida (Tung, 2007).

Citometria de fluxo atualmente é a única plataforma tecnológica que pode analisar adequadamente os componentes complexos do sistema imunológico (pode caracterizar separadamente as dúzias, ou centenas, de subgrupos de leucócitos. O advento da citometria de fluxo policromática (capaz de medir 5 ou mais cores) teve impacto dramático na habilidade de revelar a biologia das células T. Os citômetros de fluxo mais atuais podem medir até 20 parâmetros, sendo 2 físicos (tamanho e granularidade celular) e 18 fluorescências. Inicialmente deve ser feita uma lista de antígenos de interesse que posteriormente são classificados nas 3 categorias seguintes: Antígenos Primários – são bem caracterizados e identificam grandes subgrupos de células (ex: CD3, CD4, CD8, CD14, CD19 ou CD20).

O fator de necrose tumoral (TNF), as interleucinas (IL-1 e IL-6) e as prostaglandinas têm sido apontados como os principais mediadores da patogênese da AR por modularem a migração de células, a ativação de células T e B, proliferação sinovial e a destruição da cartilagem e erosão óssea (Choy *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 1996). No presente trabalho serão analisadas as citocinas IL-1 e TNF- α , que servem como marcadores da inflamação no modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos.

Preparação da Amostra para Citometria de Fluxo e Controles

A maioria dos anticorpos ligam-se bem aos antígenos de interesse à temperatura ambiente ou a 4°C. Muitas vezes é necessário adicionar colorações específicas para células mortas para que estas sejam excluídas da pesquisa, neste caso esse deve ser o primeiro procedimento realizado, seguido da classificação dos marcadores de superfície celular, fixação/permeabilização, e finalmente a classificação dos marcadores intracelulares (Mahnke *et al.*, 2007).

Metotrexato

O metotrexato (MTX), um imunossupressor largamente utilizado a partir dos anos 80, é atualmente reconhecido como a droga de referência para o tratamento da AR. Se usado como monoterapia, é capaz de controlar as manifestações clínicas, levar a melhora funcional e deter a progressão radiológica (Choi *et al.*, 2002). Foi também demonstrada a sua capacidade de intervir com o prognóstico da doença, sendo implicado na redução da mortalidade cardiovascular associada à AR (Carette, 2007).

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral:

Avaliar a ação do extrato aquoso de folhas de *Pouteria nuda*, administradas por via intraperitoneal, no tratamento da artrite induzida em ratos por *M. tuberculosis*.

4.2. Objetivo Específico

a) Analisar, por meio da elevação ou não das citocinas IL-1 e TNF- α , medidas por citometria de fluxo, a resposta da artrite induzida por adjuvante ao extrato.

b) Avaliar a progressão do edema das patas através de pletismometria digital.

5. Material e Métodos

5.1. Extrato

Foi utilizado o extrato aquoso de folhas de *Pouteria nuda* (figura1). A planta, que pertence à família Sapotaceae, foi coletada na reserva Adolpho Ducke, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Inicialmente foi realizada a coleta das folhas, galhos e cascas da *P. nuda*, posteriormente foi preparado o extrato de cada material com metanol e clorofórmio através de contínua extração, e água através de infusão seguida de filtração e total evaporação do filtrado (Carneiro *et al.*, 2008).



Figura 1: Exsicata e ficha de *E. nuda* Registro n° 179316 do Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

5.2. Modelo Animal

Foram utilizados 24 ratos albinos (*Ratus norvegicus*) da linhagem Lewis, obtidos do biotério da Universidade Federal do Amazonas, distribuídos em 4 grupos experimentais. Todos os animais utilizados durante o experimento foram mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração própria para ratos de laboratório de marca Purina e água *ad libitum*, em condições controladas de iluminação (ciclo 12h claro/escuro) e temperatura (25°C). Utilizaram-se indivíduos machos com 5 a 6 semanas de vida e com peso entre 200g e 300g (Wauben *et al*, 1994; Xavier, 2005). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. O trabalho, com protocolo no. 014/2010-CEEA, recebeu aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas .

Os animais foram separados da seguinte forma:

Grupo 1 controle negativo: sem indução de artrite e sem tratamento, n=6

Grupo 2 controle positivo: com indução de artrite e sem tratamento, n=6

Grupo 3 teste com MTX: com indução de artrite e tratado com metotrexato n=6

Grupo 4 teste com *Pouteria nuda*: com indução de artrite e tratado com extrato, n=6

5.3. Modelo de indução de artrite (*Mycobacterium tuberculosis*).

O modelo experimental de artrite induzida por Adjuvante Completo de Freund (CFA) em ratos é muito empregado na investigação de novas terapias para artropatias inflamatórias crônicas, como a artrite reumatoide (Joe; Wilder, 1999). Nesse modelo, a

artrite é induzida através da injeção intradérmica na base da cauda de uma suspensão de *Mycobacterium tuberculosis* ou *Mycobacterium butyricum* em parafina líquida (Knight *et al.*, 1992; Mia *et al.*, 2008; Banik *et al.*, 2002). O CFA atua como estímulo de respostas imunológicas a antígenos, incluindo imunidade celular e aumento da produção de certas imunoglobulinas, levando ao desenvolvimento de uma reação articular inflamatória intensa dependente de células T.

A área a receber a injeção foi tricotomizada e uma solução de álcool iodado (1%) aplicada nessa superfície. A indução da artrite foi feita mediante injeção subcutânea de 200 μ L (0,2 ml) da solução de CFA (5mg/ml de Mbt) na base da cauda (Zhang *et al.*, 2009), com uma seringa de 1 mL e agulha 13 x 4,5 mm. Esse dia foi chamado de dia 0 (zero).

5.4. Avaliação do Desenvolvimento da Artrite

O edema das patas foi avaliado por observador treinado o qual não participou do planejamento do experimento (avaliação cega). O volume das patas traseiras foi medido nos dias 0, 7, 14, 21 de experimento através de pletismômetro digital (figura 2). Cada pata traseira foi medido 3 vezes e feito uma média, os valores foram medidos em ml correspondente ao deslocamento de líquido na cuba do aparelho, apresentados em marcador digital.

O percentual do edema foi calculado através da fórmula: $1 - \frac{V_t}{V_c} \times 100$, onde V_t corresponde ao volume de uma pata tratada e V_c o volume da pata controle.



Figura 2: Obtenção do volume das patas traseiras de rato em pletismômetro Insight ® modelo EFF-304.

5.5. Via de Administração

A dose foi determinada a partir de experimento piloto de “dose-resposta” o qual marca o tempo que o animal passou lambendo a pata (*licking-time*), cronometrado em

duas fases (0-5 minutos, primeira fase; 15-30 minutos, segunda fase). Em geral a resposta inicial está relacionada à nocicepção, enquanto a segunda fase à resposta inflamatória local onde os resultados apontaram como dose ideal 0,3g/kg ou 300mg/kg, ajustada para cada animal do grupo. A solução foi introduzida no peritônio com uma seringa de 1mL.

5.6. Avaliação do Perfil de citocinas por Citometria de Fluxo

5.6.1 Coleta de sangue por punção cardíaca

Os animais foram anestesiados com Isoflurano e a coleta do sangue foi realizada por punção cardíaca ventricular após laparotomia mediana.

Foram coletados 5mL de sangue e dispensados em tubos coletores do tipo *microtainer* contendo gel separador para citometria de fluxo. O material foi devidamente armazenado sob refrigeração e encaminhado ao Laboratório da Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas (HEMOAM) para a realização dos exames.

5.6.2 Análise da amostra de sangue no citômetro de fluxo para a detecção de citocinas

De acordo com o método descrito por Mitelman *et al.* (2009), foram utilizados Kits CBA (BD Biosciences) (*cytometric beads array*) para a quantificação das citocinas TNF e IL-1. Duas populações de *beads* com diferentes intensidades de fluorescência são conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina, misturadas para formar o CBA e lidas no canal FL-3 do citômetro de fluxo FACScalibur (BD). As populações de *beads* são visualizadas de acordo com as respectivas intensidades de fluorescência: da menos brilhante para a mais brilhante. No CBA, as *beads* de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio em “sanduíche”. Os tubos para aquisição são preparados com: 50 μ L de amostra de sangue, 50 μ L da mistura de *beads* e 50 μ L do reagente de detecção Th1/ Th2 PE. Os tubos são homogeneizados e incubados por três horas, em temperatura ambiente, no escuro. Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o software CellQuest (BD).

5.7. Eutanásia

Após a coleta do sangue, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob anestesia com Isoflurano. Foram submetidos ao método os 24 animais.

5.8. Análise Estatística

Para a análise descritiva dos dados foram utilizadas ferramentas de estatística básica expostas através de tabelas e gráficos variados.

Os resultados foram testados quanto a sua normalidade, independência e homocedacidade através de testes estatísticos. Uma ANOVA para comparação entre grupos foi aplicada. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. As análises estatísticas foram realizadas nos pacotes estatísticos R e/ ou Minitab®.

6. Resultados

6.1. Protocolo Otimizado para o Experimento

Após revisão de literatura decidiu-se realizar um experimento piloto no mês de dezembro de 2010 com o objetivo de ratificar a curva cinética da artrite induzida por adjuvante e estabelecer um protocolo otimizado para as condições locais de realização da pesquisa. A partir deste experimento foi possível observar uma diferença entre os resultados encontrados na literatura para o pico máximo de edema e aqueles encontrados no experimento, foi proposto um protocolo com o objetivo de otimizar resultados nos próximos experimentos (tabela 1).

Item	Padrões Utilizados e Resultados	Padrões Adotados
Número de Animais	16	Grupo Mínimo – 8 animais
Sexo	Fêmeas	À Critério do Pesquisador
Peso	175 – 220g	200 – 220g
Adjuvante Completo de Freud	Difco – <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Ra	Alternativa: <i>M. bovis</i> (Butantã)
Incidência de Artrite	98 – 100%	-
Pico de Artrite (dias)	29 dias	27 ^o a 35 ^o dias (Curva Padrão)
Diâmetro Dianteiro Máximo (Média/Mediana)	36,27 / 36,47 no 29 ^o dia	-
Diâmetro Trazeiro Máximo (Média/Mediana)	43,63 / 43,16 no 29 ^o dia	-
Escore Máximo/animal	11,62	-
Escore Total Máximo	198 no 29 ^o dia	122 no 27 e 35 ^o dias
Recuperação Total	45 dias	45 dias
Período Ideal para Experimentação de Fármacos	0 e 7 ^o dias	0 - 10 ^o dias
Dias Ideais para Avaliação de Severidade	0, 7 ^o , 14 ^o , 28-32 ^o , 40 ^o , 45 ^o dias	-
Locais Ideais para Medida de Diâmetro	Metatarsofalangeanas	Joelho Posterior
Dias de Sacrificio para Análise Histopatológica	14 ^o , 25 ^o , 35 ^o e 40 ^o dias	-

Tabela 1: Na segunda coluna (Padrões Utilizados e Resultados) encontram-se os valores adotados no experimento realizado em dezembro, na terceira coluna (Padrões Adotados) encontram-se sugestões com o objetivo de otimizar os resultados nos próximos experimentos.

6.2. Padronização da Dose do Medicamento Controle

Em fevereiro de 2011, um segundo experimento piloto foi realizado com o objetivo de estabelecer a dose padrão do Metotrexato, medicamento controle, padrão ouro no tratamento da Artrite Reumatoide. Foi utilizado o Modelo de Artrite Induzida por Adjuvante Completo de Freund em ratos (AIA) para avaliar o efeito do metotrexato em diferentes concentrações.

Grupos de ratos foram separados nas doses semanais de 25 μ g, 75 μ g, 150 μ g e 250 μ g. Essas doses foram calculadas a partir de doses usadas em humanos entre 0,1mg e 2mg/Kg/Semana. A partir das amostras de sangue foram realizados hemograma e bioquímica. A Curva Dose-Resposta mostrou que doses acima de 150 μ g/semana não produzem efeito adicional para redução de edema. Além disso, a comparação da leucometria dos diferentes grupos mostrou que não houve influência do metotrexato sobre a contagem de células nas doses selecionadas. O estudo da função hepática revelou que a dose de 250 μ g/semana foi a mais hepatotóxica.

Considerando a curva dose-resposta sugere-se que a dose experimental utilizada seja de 75 a 150 μ g/semana. Nestas doses haverá efeito antiartrítico máximo, sem toxicidade hepática aguda, permitindo a comparação de fitoterápicos com tratamentos Gold Standard para artrite.

6.3. Curva de Artrite

A medida das patas traseiras foi medida por pletismometria (Gráfico 1).

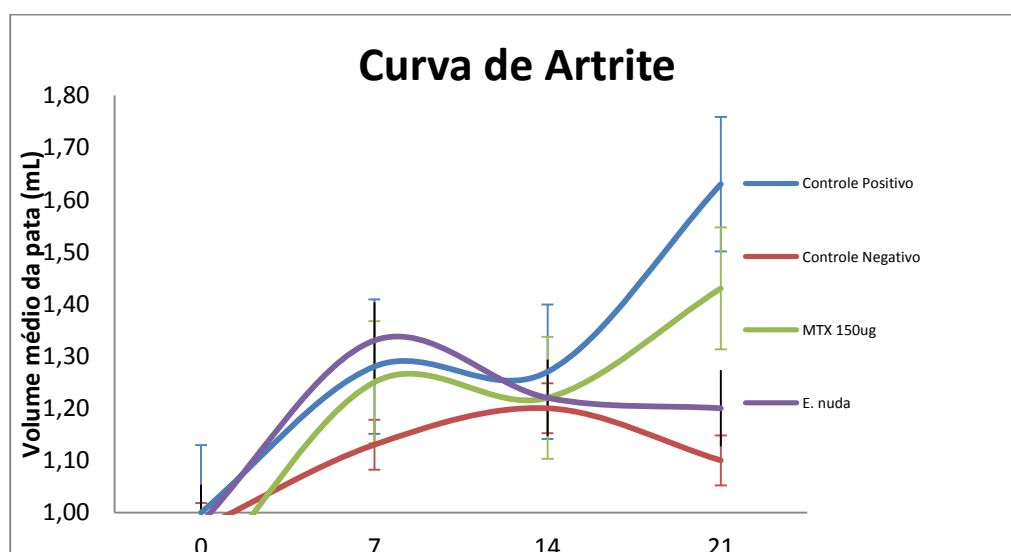


Gráfico 1. Curva de artrite para os diferentes grupos medidos nos dias 0, 7, 14 e 21. Grupo tratado com *P. nuda* mostrou redução significativa do edema (ml) no 21º dia.

6.4. Perfil de Citocinas

Após as padronizações da dose do metotrexato e da dose do extrato de *P. nuda* para os ratos, em janeiro de 2012, foi realizado o experimento final do Projeto. O sangue, coletado por punção cardíaca, foi encaminhado ao Laboratório da Fundação de Hemoterapia e Hematologia do Amazonas (HEMOAM) para a realização dos testes de citometria de fluxo para dosagem das citocinas escolhidas (IL-1 e TNF- α), envolvidas na artrite inflamatória. Com os resultados obtidos foram elaborados gráficos (Gráfico 2), que demonstraram que apesar da diminuição do edema nas patas dos ratos tratados com *P. Nuda* não houve diminuição das citocinas inflamatórias (IL-1 e TNF- α).

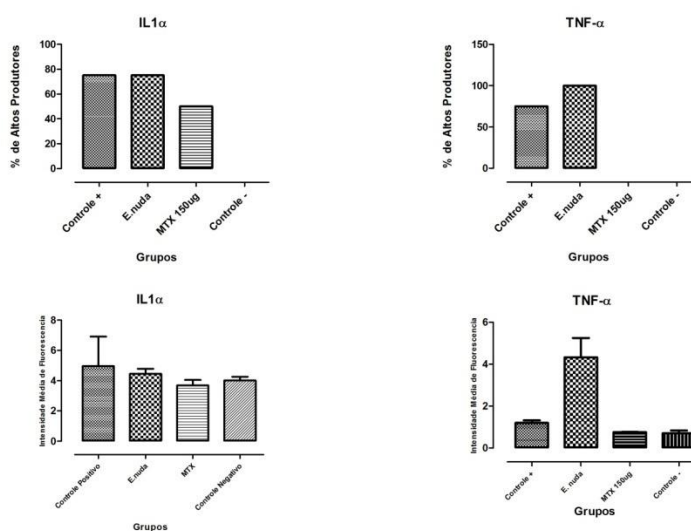


Gráfico 2: Perfil de Citocinas

7. Discussão

Há aumento persistente da produção local e sistêmica de TNF, IL-1 beta, e IL-6. O desenvolvimento da artrite induzida por CFA iniciou-se 4 a 7 dias após a inoculação. Por apresentar características inflamatórias, incluindo elevação de citocinas e resposta variável a diferentes drogas imunossupressoras, esse modelo tem-se demonstrado útil no estudo de mecanismos imunopatogênicos da artrite reumatoide e no estudo pré-clínico de novas terapias (Inglis *et al.*, 2005). No exemplo deste trabalho, a nova terapia testada foi o extrato aquoso de folhas de *Pouteria nuda*.

Foi verificado que o anestésico xilazina tem efeito anti-inflamatório por inibir a expressão CD11 em polimorfonucleares e a explosão respiratória (*respiratory burst*), efeito demonstrado em modelos de endotoxemia (Zhou *et al.*, 2007). Este último aspecto inviabiliza o uso de xilazina e cetamina como combinação anestésica em

9. Bibliografia

1. Anderson, G. D. *et al.* **Selective inhibition of cyclooxygenase (COX)-2 reverses inflammation and expression of COX-2 and interleukin 6 in rat adjuvant arthritis.** J Clin Invest, v. 97, n. 11, p. 2672-9. 1996.
2. Banik, Ratan Kumar *et al.*, **Reexamination of the Difference in Suceptibility to Adjuvant-Induced Arthritis among Lew/Crj, Slc/Wistar/ST and Slc/SD Rats.** Exp. Animal. v. 51, n. 2, p. 197-201, 2002.
3. Batulis, J. C. **Nature's Pharmacy.** HMS Beagle, The BioMedNet Magazine. Issue 58, July 9, 1999.
4. Carneiro, A. L. B. **Potencial Citotóxico e Antimicrobiano de Plantas da reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus-AM. Manaus: UFAM, 2007.** Tese de Doutorado em Biotecnologia.
5. Carneiro, A. L. B.; Teixeira, M. F. S.; Oliveira, V. M. A.; Fernandes, O. C. C.; Cauper, G. S. B.; Pohlit, A. M. **Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke Forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 103 (1): 31-38, February, 2008.
6. Carette, S. **All patients with rheumatoid arthritis should receive corticosteroids as part of their management.** J Rheumatol, v. 34, n. 4, p. 656-660, 2007.
7. Chengelis, C. P.; Kiskpatric, J. B.; Regan, K. S.; Radovsky, A. E.; Beck, M. J.; Morita, O.; Tamaki, Y.; Suzuki, H. **28-Day oral (gavage) toxicity studies of green tea cetechins prepared for beverages in rats.** Food and Chemical Toxicology, 46: 978-989, 2008.
8. Choi, H. K., *et al.* **Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid Arthritis: a prospective study.** Lancet, v. 359, n. 9313, p. 1173-1177, 2002.
9. Emery, P. **The Roche Rheumatology Prize Lecture. The optimal management of early rheumatoid disease: the key to preventing disability.** Br J Rheumatol, v. 33, n. 8, p. 765-768, 1994

10. Fries, J.F, *et al.* **Reduction in long term disability in patients with rheumatoid arthritis by disease-modifying antirheumatic drug-based treatment strategies.** *Arthritis Rheum*, v. 39, n. 4. P. 616-622. 1996.
11. Inglis, J. J. *et al.* **The differential contribution of tumour necrosis factor to thermal and mechanical hyperalgesia during chronic inflammation.** *Arthritis Res Ther*, v.7, n. 4, p. R807-16, 2005.
12. Joe, B.; Wilder, R. L. **Animal models of rheumatoid arthritis.** *Mol Med Today*, v. 5, n. 8, p.367-369. 1999.
13. Knight, B.; Katz, D. R.; Isenberg D. A.; Ibrahim M. A.; Le Page S.; Hutchings P.; Schwartz R. S., Cooke A. **Induction of adjuvant arthritis in mice.** *Clin Exp Immunol*. Dec: 90 (3):459-65. 1992.
14. Koehn, F. E.; Carter, G. T. **The Evolving Role of Natural Products in Drug Discovery.** *Nature Reviews – Drug Discovery* Vol 4, 2005.
15. Lawal, I. O.; Uzokwe, N. E.; Igboanugo, A. B. I.; Adio, A. F.; Awosan, E. A.; Nwogwugwu, J. O.; Faloye, B.; Olatunji, B. P.; Adesoga, A. A. **Ethno Medicinal information on collation and identification of some medicinal plants in Research Institutes of South-west Nigeria.** *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Vol. 4(1). pp. 001-007, January, 2010.
16. Ma, J.; Yang, H.; Basile M.J.; Kennelly, E.J.; **Analysis of polyphenolic antioxidants from the fruits of three *Pouteria* species by selected ion monitoring liquid chromatography-mass spectrometry.** *J Agric Food Chem* 52: 5873-5878, 2004.
17. Mahnke, Y. D; Roederes, M. **Optimizing a Multicolor Immunophenotyping Assay.** *Clinics in Laboratory Medicine* 27 (2007) 469–485

18. Manosroi, A.; Saraphanchotiwitthaya, A.; Manosroi, J. **In vitro immunomodulatory effect of *Pouteria cambodiana* (Pierre ex Dubard) Baehni extract.** *J Ethnopharmacol* 101: 90-94, 2005.
19. Manosroi, A.; Saraphanchotiwitthaya, A.; Manosroi, J. **Effects of *Pouteria cambodiana* extracts on in vitro immunomodulatory activity of mouse immune system.** *Fitoterapia* 77: 189-193, 2006.
20. Mia M. Y. *et al.* **The Dynamics of Articular Leukocyte Traffcking and the Immune Response to Self Heat-Shoch Protein 65 Influence Arthritis Susceptibility.** *J Clin Immunol*, v. 28, p. 420-431, Mai. 2008.
21. Montenegro, L.H.M.; Oliveira, P.E.S.; Conserva, L.M.; Rocham, E.M.M.; Brito, A.C.; Araújo, R.M.; Trevisan, M.T.S.; Lemos, R.P.L. **Triterpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterástico de *Pouteria venosa* L (Sapotaceae).** *Rev Bras Farmacogn* 16: 611-617, 2006.
22. Murch, S. J.; KrishnaRaj, S.; Saxena, P. K. **Phytofarmaceuticals: Problems, Limitations, and Solutions.** *Scientific Review of Alt Med* 4(2):33-37, 2000.
23. O'Dell, J. R. **Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis.** *New England Journal of Medicine, Massachusetts*, v. 350, p.2167-2179, may 2004.
24. Oliveira, V. M. A.; Carneiro, A. L. B.; Cauper, G. S. B.; Pohlit, A. M. **In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aagregation in human blod.** *Acta Amazonica*. Vol 39(4) 2009: 973-980.
25. Perfeito, J.P.; Santos, M.L.; Lopez, K.S.E.; Paula, J.E.; Silveira, D.; **Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study.** *Rev Bras Farmacogn* 15: 183-186, 2005.
26. Pinto, M. R. C; Miguel, R. C. C.; Rezende, G. G. **Tratamento da Artrite Reumatoide.** *Rev Bras de Reumatologia*, v. 46, n. 3, p. 219-223, mai/jun, 2006.

27. Rong, X.; Peng, G.; Suzuki, T.; Yang, Q.; Yamahara, J.; Li, Y. **A 35-day gavage safety assessment of ginger in rats.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 54: 118-123, 2009.
28. Rout, S. D.; Panda, T.; Mishra, N. **Ethno-medicinal Plants Used to Cure Different Diseases by Tribals of Mayurbhanj District of North Orissa.** *Ethno-Med*, 3(1): 27-32, 2009.
29. Swenson, U.; Anderberg A. A. **Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales).** *Cladistics* 21: 101-130, 2005.
30. Tuma, R. S. **Rainforest Research - The South American Office for Anticancer Drug Development.** HMS Beagle, The BioMedNet Magazine. Issue 104, June 8, 2001.
31. Tung, J. W. *et al.* **Modern Flow Cytometry: A Practical Approach.** *Clinics in Laboratory Medicine* 27 (2007) 453–468.
32. Van Der Heijde, D. M. *et al.* **Bianual radiographic assessments of hands and feet in a three-year perpective followup of patients with early rheumatoide arthritis.** *Arthritis Rheum.* V. 35, p 26-34, 1992.
33. Van Der Horst-Bruinsma, I. E., *et al.* **Diagnoses and course of early-onset arthritis: results of a special early arthritis clinic compared to routine patient care.** *Br J Rheumatol*, v. 37, n. 10, p. 1084-1088, 1998.
34. Wauben, M. H. M.; Wagenaar-Hilbers, J. P. A.; Van Éden, W.; Adjuvant Archtritis. In: Cohen, I.R.; Miller, A. **Autoimmune diseases models.** San Diego: Academic Press, 201p, 1994.
35. Wilder, R. L. *et al.* **Genetic factors regulating experimental arthritis in mice and rats.** *Curr Dir Autoimmun*, 1: p 121-65, 1999.
36. Xavier, C. A. C. **Efeito do Fucoidam de *Fucus Vesiculosus* em um modelo experimental de artrite reumatoide.** 2005, 83p. Dissertação (Mestrado em

Bioquímica). Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

37. Zhou, Z. Q. et al. **Ketamine inhibits polymorphonuclear leucocyte CD11b expression and respiratory burst activity in endotoxemic rats.** *Inflamm Res*, v. 56, n. 4, p. 149-53, Apr 2007.